

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
AO 4045

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE PARIS

—
par

Monsieur Jean LEVETEAU

—
pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet : Discrimination qualitative et spatiale par les glomérules
olfactifs

soutenue le : 25 FEV. 1970 devant la Commission d'Examen

— MM. AM. MONNIER

Président

P. BUSER

P. LAGET

Examineurs

Y. GALIFRET



La discrimination des odeurs par les glomérules olfactifs du lapin : influence de la concentration du stimulus⁽¹⁾

PAR

J. LEVETEAU et P. MAC LEOD

(Laboratoire de Physiologie générale, Faculté des Sciences, Paris) (2).

Les premières indications apportées sur les réponses électriques évoquées dans les glomérules olfactifs par une stimulation odorante, semblent prouver leur faible sélectivité (LEVETEAU et MAC LEOD, 1966), en contraste surprenant avec la finesse de discrimination effectivement réalisée par l'animal entier. Cette constatation nous a amenés à entreprendre une nouvelle série d'expériences portant sur un plus grand nombre de stimulus, choisis en fonction de critères définis et employés à des concentrations différentes. En effet, d'une part le choix des stimulus initialement utilisés, avait été dans une large mesure arbitraire et d'autre part, leur concentration était élevée. Ces deux faits pouvaient contribuer l'un par hasard, l'autre systématiquement, à diminuer la sélectivité (BEIDLER, 1966).

TECHNIQUES

Nous avons donc repris exactement le même dispositif expérimental, mais cette fois avec 12 stimulus différents. La gamme que nous avons choisie répond aux trois conditions suivantes :

1° Elle est formée de substances hautement purifiées, stables chimiquement et dont les odeurs sont très nettement différentes.

(1) Reçu le 18 janvier 1968. Accepté le 17 février 1968.

(2) 9, quai St-Bernard, Paris-5^e.

2° Ces corps se rangent d'une façon régulière d'un bout à l'autre de l'échelle des paramètres de solubilité définis par MULLINS (1955) comme nécessaires à l'efficacité odorante. Deux corps dont le paramètre de solubilité diffère de plus de deux unités forment deux phases distinctes alors que si les paramètres de solubilité sont voisins, ces substances sont miscibles en toutes proportions. Toutes les substances odorantes ont un paramètre de solubilité compris entre 5 et 15 (HILDEBRAND et SCOTT, 1936).

3° Enfin ces substances se répartissent au mieux sur l'ensemble du diagramme de DAVIES (1965) qui relie l'efficacité odorante à la dimension des molécules et à leur énergie d'adsorption sur un interface hydrolipidique (fig. 1).

Cette gamme des 12 stimulus a été présentée successivement à deux concentrations différentes :

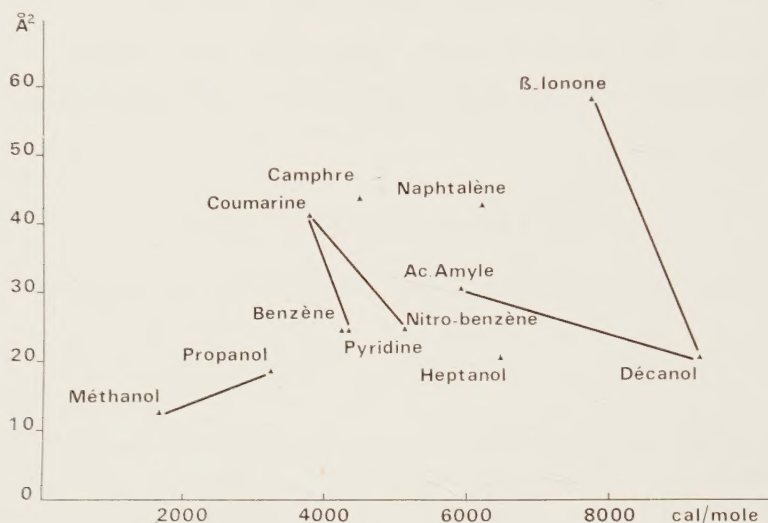


FIG. 1. — Diagramme de Davies. En abscisses : énergie d'adsorption sur une interface hydrolipidique ; en ordonnées : section de la molécule perpendiculairement à son axe de polarisation électronique.

Les segments de droite qui relient certains points deux à deux représentent un degré de corrélation particulièrement élevé entre les séries de glomérules excités par les deux substances correspondantes (voir tableau II).

— la première série de mesures a été effectuée à une concentration infra-maximale du point de vue de l'électro-olfactogramme (E.O.G.), correspondant à une intensité subjective forte pour un observateur humain :

— la deuxième série a été réalisée à partir de concentrations 100 à 1 000 fois plus faibles, donnant un E.O.G. d'amplitude égale au tiers du maximum, correspondant pour l'observateur humain à une intensité subjective faible bien que nettement discriminable.

Nous avons déterminé par stéréotaxie la position de l'électrode selon les directions frontale et latérale en vue d'établir la topographie précise de la distribution des potentiels évoqués glomérulaires en fonction des stimulus.

Les 12 stimulus que nous avons employés sont rangés dans le tableau I qui donne également la dimension de la molécule, l'énergie d'adsorption, le coefficient de partage huile/eau, le coefficient de partage huile/air selon des données de DAVIES et TAYLOR (1959), ainsi que le paramètre de solubilité selon nos calculs.

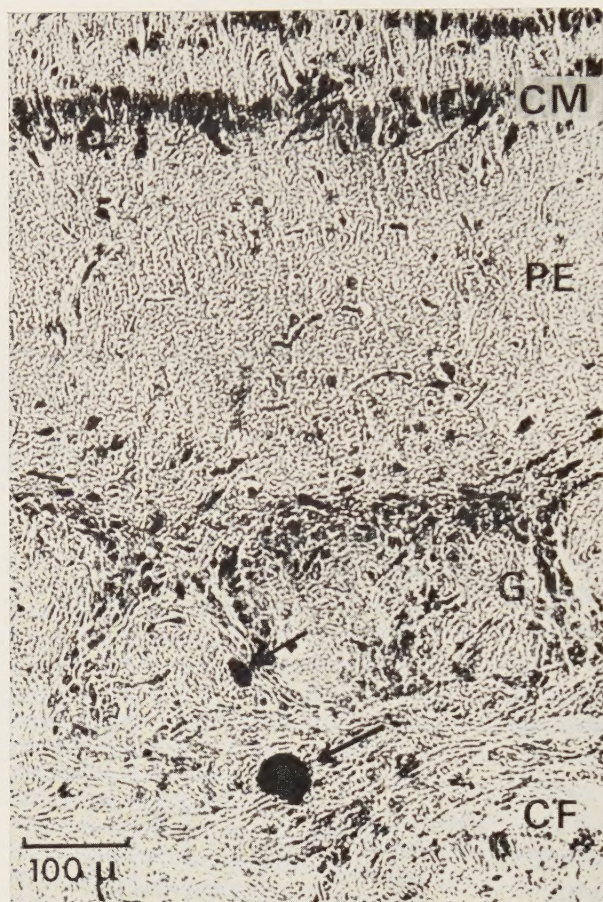


FIG. 3. — Microphotographie d'une portion de bulbe olfactif coloré à la thionine.

CM : couche des cellules mitrales.

PE : couche plexiforme externe.

G : couche des glomérules.

CF : couche fibrillaire.

Les deux taches arrondies repérées par des flèches dans la moitié inférieure de la figure marquent l'emplacement des électrodes d'enregistrement.

RÉSULTATS

A. Stimulation de forte intensité.

L'exploration de 96 glomérules appartenant à 40 animaux différents, a donné un résultat semblable à celui que nous avons déjà obtenu au cours de la précédente investigation (LEVETEAU et MAC LEOD, 1966), bien que quatre seulement des stimulus (propanol, acétate d'amyle, benzène et bêta-ionone) soient communs aux deux séries d'expériences.

TABLEAU I.

	Section en Å ²	Energie d'adsorption cal/mole	log K huile eau	log K huile air	$\delta = \sqrt{Hd}$
Méthanol	12,4	1 655	1,235	5,48	14,5
Propanol.....	18,3	3 240	2,41	6,22	11,5
Naphtalène ...	42	6 270	4,63	6,49	10,8
Coumarine ...	41,3	3 800	2,83	7,31	10,5
Pyridine	24	4 350	3,25	8,03	10,2
Nitrobenzène .	24,1	5 175	3,85	6,99	9,7
Camphre	43,6	4 500	3,33	5,98	9,5
Benzène	24	4 150	3,09	3,84	9,1
Heptanol	20	6 475	4,81	7,65	8,7
Acét. amyle...	30	4 875	3,63	5,45	8,3
Décanol	20	9 325	6,94	8,98	8
β -ionone	57,6	7 800	5,79	8,35	7,1

δ = coefficient de solubilité selon HILDEBRAND et SCOTT (1936).
H = chaleur de vaporisation exprimée en cal/g.
d = densité.

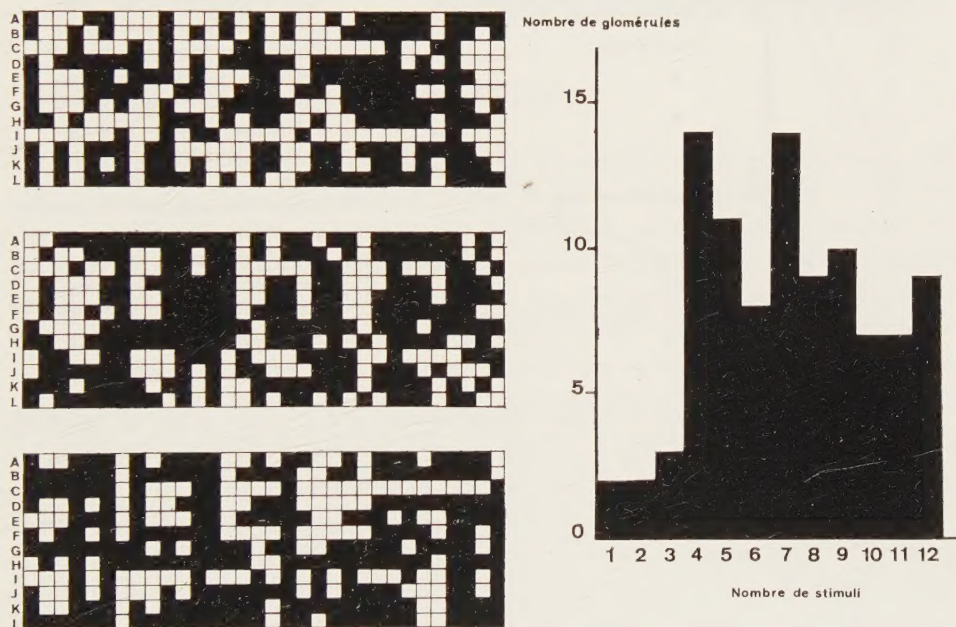


FIG. 4. — Réponses de 96 glomérules à 12 stimulus d'intensité élevée. *A gauche* : tableau de la répartition réelle des réponses de chaque glomérule à chacun des 12 stimulus. Chaque colonne verticale correspond à un glomérule : chaque ligne horizontale correspond à un stimulus. Les carrés noirs signifient la présence d'une réponse, les blancs l'absence d'une réponse.

A : méthanol B : propanol C : naphtalène
D : coumarine E : pyridine F : nitrobenzène
G : camphre H : benzène I : heptanol
J : acétate d'amyle K : décanol L : β -ionone

A droite, histogramme du nombre des glomérules en fonction du nombre de stimulus auxquels ils sont sensibles.

Neuf glomérules ont répondu aux 12 stimulus sans aucune sélectivité. Parmi les 87 autres, on trouve toutes les éventualités possibles, certains glomérules ne répondent qu'à un stimulus, d'autres à 11, alors que tous les intermédiaires sont représentés. La répartition de ces glomérules en fonction de leur sélectivité (fig. 4) démontre une distribution bimodale avec un groupe dont la sélectivité est d'environ 30 % et l'autre d'environ 60 %.

B. Stimulation de faible intensité.

Nous avons exploré 32 glomérules appartenant à 15 animaux avec une intensité beaucoup plus faible du stimulus odorant en vue de vérifier si la sélectivité obtenue dans ces conditions était différente.

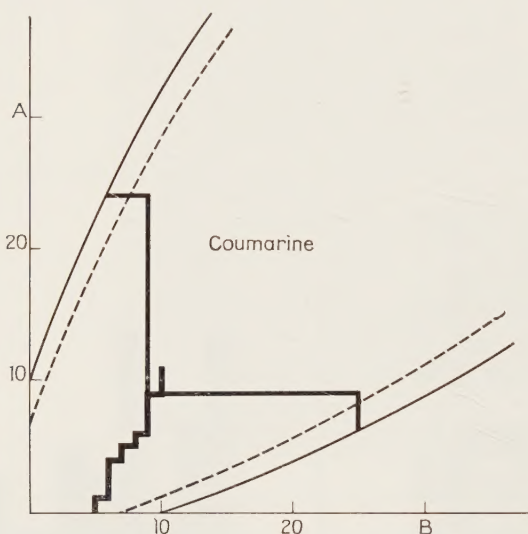


FIG. 5. — Exemple d'analyse séquentielle de la réponse à la coumarine à intensité forte (A) comparée à l'intensité faible (B) (diagramme de BROSS, 1952, d'après WALD, 1947).

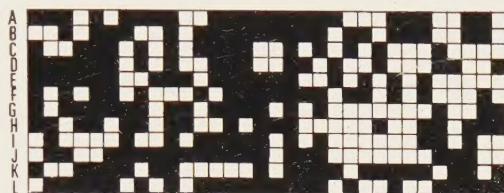
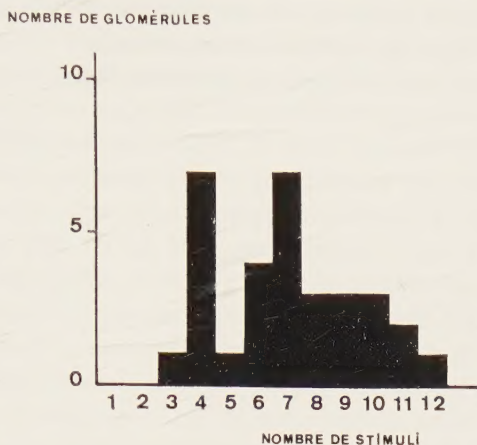
Les glomérules des deux séries sont considérés d'une manière bi-univoque dans l'ordre chronologique : un segment vertical de longueur unité correspond à l'existence d'une réponse pour l'intensité forte seulement ; un segment horizontal correspond à une réponse pour l'intensité faible seulement. En cas de réponse ou de non-réponse simultanée aucun segment n'est porté.

La concordance des deux séries d'expériences a été jugée selon la méthode d'analyse séquentielle de WALD (1947). Cette méthode permet de porter sur un graphique, au fur et à mesure, le résultat des expériences et de suivre l'apparition d'une différence ou d'une identité statistiquement significative avec une remarquable économie de sujets. Nous avons porté sur un diagramme de BROSS (1952), établi d'après WALD (1947) en respectant ses conventions, le résultat des mesures correspondant à chaque stimulus en portant en abscisses l'intensité forte et en ordonnées l'intensité faible. L'expérimentation a cessé lorsque les 12 graphiques eurent franchi la limite de $p = 0,05$ dans la zone d'identité (fig. 5).

La répartition des sélectivités (fig. 6) est identique à celle qui résultait d'une forte intensité de stimulation.

FIG. 6. — Réponse de 32 glomérules à 12 stimulus d'intensité faible.

Mêmes conventions que pour la fig. 4.



DISCUSSION

La localisation de l'électrode au sein des glomérules a été confirmée par marquage coloré au bleu de méthyle et par contrôle histologique (fig. 3) de telle sorte qu'aucun doute ne peut subsister à son sujet. La topographie des réponses évoquées glomérulaires, établies selon les coordonnées stéréotaxiques de chaque expérience, est donnée par la série des 12 diagrammes cumulatifs de la fig. 7. Ces diagrammes rassemblent les données de tous les bulbes explorés en fonction des stimulus et donnent donc une représentation purement spatiale d'événements qui se succèdent dans le temps et qui correspondent à des individus différents. Ce point ne doit pas être perdu de vue au cours de l'interprétation.

D'après les résultats classiques d'ADRIAN (1950, 1956), de MOZELL et PFAFFMANN (1954), de MOZELL (1958), généralement admis à l'heure actuelle, on s'attendrait à voir les potentiels évoqués par l'acétate d'amyle, le méthanol et le propanol prédominer dans la partie antérieure du bulbe olfactif alors que les potentiels évoqués par le benzène, le naphthalène et la bêta-ionone se projetteraient dans la partie postérieure du bulbe. Or il n'en est rien, ainsi qu'en témoigne la fig. 7. Cette contradiction est très inattendue et son interprétation risque d'apporter des éléments nouveaux à nos connaissances des relations fonctionnelles entre la couche des glomérules et la couche des cellules mitrales.

La topographie des réponses glomérulaires ne prend tout son sens à nos yeux que dans la mesure où elle peut contribuer à la compréhension des mécanismes de la discrimination des odeurs. Faute de critères plus directs, il semble utile

de tenter une recherche de corrélations entre la nature des stimulus et les canaux vecteurs de l'information correspondante.

Dans cet ordre d'idées, nous avons déjà eu connaissance des travaux de GES-



FIG. 7. — Topographie des réponses glomérulaires. On a figuré par un point dans chaque schéma l'emplacement de chacun des 128 glomérules étudiés s'il était excité par le stimulus correspondant. On n'a rien inscrit dans le cas contraire.

TELAND et coll. (1963), de BOECKH et coll. (1965) au niveau du récepteur, et de DOVING (1966) au niveau des neurones bulbaires. Ce dernier a développé une méthode de calcul lui permettant de donner une représentation semi-quantitative de la similitude olfactive (« olfactory relatedness »). Même en ajoutant les

résultats obtenus par les psycho-physiciens, soit par des mesures d'adaptations croisées (BACKMAN, 1917 ; CHEESMAN et MAYNE, 1953 ; KOSTER, 1965 ; MAC LEOD et coll., 1966 ; PERRIN, 1966), soit par la recherche de jugements de proximité (JONES et WOSKOW, 1964) on n'arrive qu'à une interprétation fragmentaire.

Afin d'apporter quelques précisions concernant le relais glomérulaire, nous avons calculé dans quelle mesure certaines paires de stimulus ont une action identique sur les mêmes glomérules avec une fréquence supérieure à celle d'une distribution aléatoire, selon le critère du χ^2 . Plus précisément, nous avons effectué le calcul sur le cas complémentaire, c'est-à-dire sur la proportion des glomérules répondant différemment à la paire de stimulus considérée. Le résultat de ce calcul apparaît sur le tableau II ; les valeurs les plus élevées du χ^2 peuvent être interprétées comme indiquant un certain degré de chevauchement entre les canaux vecteurs d'informations. Nous avons traduit cette idée en reliant par un segment de droite sur la fig. 1, les points correspondants aux plus fortes corrélations. On voit ainsi apparaître un groupe alcool : méthanol—propanol, un groupe coumarine—pyridine—nitrobenzène et un groupe acétate d'amyle—décanol—bêta-ionone. L'examen de chacun de ces 3 groupes montre qu'ils sont formés de corps dont les paramètres de solubilité selon MULLINS sont très voisins (tableau I) et qui, de plus, se situent autour de trois valeurs : 8, 10 et 12, suggérées par cet auteur. Bien qu'il soit extrêmement hasardeux de faire des déductions à partir d'un nombre aussi restreint de données, nous pensons qu'il y a là un argument pour soutenir l'idée que l'adsorption des molécules odorantes sur les récepteurs olfactifs obéit aux lois les plus fondamentales de la solubilité en phase liquide. Rien ne permet d'affirmer qu'il s'agit de l'un des facteurs de la discrimination olfactive mais cela en est probablement une condition.

Il est évident, lorsqu'on considère l'ensemble des réponses telles qu'elles apparaissent sur les fig. 4 et 6, que les glomérules olfactifs sont des structures peu sélectives ; cette propriété subsiste inchangée lorsque l'intensité de la stimulation diminue. En effet, pour une forte intensité, le taux global de réponse pour l'ensemble des glomérules et des stimulus est de 60 %, tandis qu'il est de 58 % pour une faible intensité.

Si la sélectivité d'ensemble est faible, on trouve représentés cependant tous les cas possibles (fig. 4 et 6) depuis 1 sur 12, jusqu'à 12 sur 12. Il est remarquable que les histogrammes (fig. 4 à droite et fig. 6 en haut), présentent une forte prédominance de la classe 4/12 et de la classe 7/12 ; la classe 7/12 correspond exactement au taux de sélectivité global de 60 %, alors que la classe 4/12 correspond à une sélectivité nettement meilleure de 33 %. Les glomérules ayant une sélectivité meilleure que 33 %, sont si peu nombreux (7/96 et 1/32 respectivement dans les cas d'une stimulation à intensité forte et faible), qu'on ne peut actuellement émettre aucune hypothèse sérieuse sur leur rôle dans la discrimination des odeurs.

Cette faible sélectivité contraste étonnamment avec les capacités très fines de discrimination olfactive mises en évidence par les études de comportement animal ou humain.

En comparant les profils des réponses glomérulaires on constate cependant leur extrême diversité et en dépit du nombre relativement élevé de glomérules explorés, l'impossibilité de reconnaître des types de réponses. La comparaison de la présente série de résultats à la précédente (LEVETEAU et MAC LEOD, 1966) suggère que, loin de diminuer, la diversité des réponses croît en fonction du nombre de mesures. Certes, il n'en serait peut-être plus de même si l'expérimentation portait sur un nombre beaucoup plus grand de stimulus différents.

Quoi qu'il en soit, deux points semblent désormais bien établis : d'une part, la sélectivité individuelle moyenne d'un glomérule est nettement inférieure à celle d'un récepteur olfactif isolé et, d'autre part, le « pattern d'activation — inhibition » des récepteurs qui constitue « l'image » olfactive au niveau épithélial est transcodé au niveau glomérulaire en une image beaucoup plus simple, en quelque sorte un schéma, qui représente l'information brute dont dispose le système nerveux central pour effectuer son travail de discrimination. La perte d'information qui résulte inévitablement de cette simplification (les glomérules sont 20 000 fois moins nombreux et 2 fois moins sélectifs), comporte heureusement une contre partie avantageuse liée à sa cause même, c'est-à-dire la convergence de très nombreux récepteurs sur un seul glomérule. En effet, l'amplitude de la réponse glomérulaire croît beaucoup plus vite en fonction de la concentration du stimulus que celle de l'ensemble des récepteurs et atteint son maximum alors que cette dernière n'est qu'à 40 % de son plein développement (LEVETEAU, 1967). Il en résulte que le schéma olfactif glomérulaire, bien que tracé à gros traits, devient complet longtemps avant que la population des récepteurs soit mise à contribution dans sa totalité : le seuil d'identification d'une substance odorante donnée, exprimée en concentration, est environ 10 fois plus élevé que son seuil absolu de détection, mais se situe encore au bas de l'échelle des intensités discriminables.

La discrimination olfactive repose donc en définitive sur une analyse fine, mettant en jeu la mémoire olfactive, des différences qui existent entre des schémas olfactifs comportant une forte proportion de traits communs : c'est un cas particulier du problème général de la reconnaissance des formes.

RÉSUMÉ

La mesure de la sélectivité des glomérules olfactifs au moyen des potentiels évoqués par 12 stimulus différents à deux niveaux d'intensité, a permis d'établir les points suivants :

- 1° La sélectivité est faible : 60 % dans l'ensemble.
- 2° Tous les degrés de sélectivité individuelle sont possibles.
- 3° Le calcul des corrélations entre séries de glomérules sensibles à deux substances distinctes conduit à penser que les paramètres thermodynamiques de solubilité du stimulus conditionnent la discrimination olfactive.

SUMMARY

**Odour discrimination by rabbit olfactory glomeruli :
effect of stimulus concentration.**

The selectivity of olfactory glomeruli has been evaluated by means of evoked potentials elicited by 12 different stimuli at two intensity levels. The following facts were found :

- 1) The selectivity was low : about 60 %.
- 2) Every possible degree of individual selectivity has been encountered.
- 3) Computed correlations between groups of glomeruli responsive to two different chemicals lead to the assumption that solubility parameters are involved, at least partially, in olfactory discrimination.

BIBLIOGRAPHIE

- ADRIAN, E. D. (1950). Sensory discrimination with some evidence from the olfactory organ. *Brit. Med. Bull.*, **6**, 330-333.
- ADRIAN, E. D. (1956). The action of the mammalian olfactory organ. *J. Laryng. Otol.*, **70**, 1-14.
- BACKMAN, E. L. (1917). Experimentella undersökningar över luktsinnetts fysiologi. *Uppsala Läk. Fören. Förh.*, **22**, 319-464.
- BEIDLER, L. M. (1966). Communication personnelle.
- BOECKH, J., KAISLING, K. E. et SCHNEIDER, D. (1965). Insect olfactory receptors. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**, 263-280.
- BROSS, I. (1952). Sequential medical plans. *Biometrics*, **8**, 188-205.
- CHEESMAN, G. H. et MAYNE, S. (1953). The influence of adaptation on absolute threshold measurements for olfactory stimuli. *Quart. J. Exp. Psychol.*, **5**, 22-30.
- DAVIES, J. T. (1965). A theory of the quality of odours. *J. theor. Biol.*, **8**, 1-7.
- DAVIES, J. T. et TAYLOR, F. M. (1959). The role of adsorption and molecular morphology in olfaction. Calculation of olfactory thresholds. *Biol. Bull.*, **47**, 22-238.
- DOVING, K. B. (1966). An electrophysiological study of odour similarities of homologous substances. *J. Physiol., London*, **186**, 97-109.
- GESTELAND, R. C., LETTVIN, J. Y., PITTS, W. H. et ROJAS, A. (1963). Odor specificities of frog's olfactory receptors. In : ZOTTERMAN, Y., ed., *Olfaction and Taste*, Pergamon Press, Oxford, 19-34.
- HILDEBRAND, J. H. et SCOTT, R. L. (1936). *The solubility of non electrolytes*. Reinhold, N. Y., 203.
- JONES, F. N. et WOSKOW, M. H. (1964). On the intensity of odore mixtures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **116**, 484-494.
- KOSTER, E. P. (1965). Adaptation, recovery and specificity of olfactory receptors. *Rev. Laryng. Bordeaux*, **86**, 890-894.
- LEVETEAU, J. (1967). Données non publiées.
- LEVETEAU, J. et MAC LEOD, P. (1966). La discrimination des odeurs par les glomérules du lapin (étude électrophysiologique). *J. Physiol., Paris*, **58**, 717-729.
- MAC LEOD, P., PERRIN, C. M. et LEVETEAU, J. (1966). Enregistrements de l'électroolfactogramme de lapin au moyen d'électrodes permanentes. *J. Physiol., Paris*, **58**, 562.
- MOZELL, M. M. (1958). Electrophysiology of the olfactory bulb. *J. Neurophysiol.*, **21**, 183-196.
- MOZELL, M. M. et PFAFFMANN, C. (1954). The afferent neural processes in odor perception. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **58**, 98-108.
- MULLINS, L. J. (1955). Olfaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **62**, 249-276.
- PERRIN, C. M. (1966). Etude de la discrimination olfactive sur animaux préparés pour l'observation permanente. *Thèse 3^e cycle Physiol., Paris*.
- THOMAS, R. C. et WILSON, V. J. (1966). Marking single neurons by staining with intra-cellular recording microelectrodes. *Science*, **151**, 1538-1539.
- WALD, A. (1947). *Sequential analysis*. Wiley, N. Y., 219 pp.

